

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THOMSON
★
DELPHION™

RESEARCH

PRODUCTS



INSIDE DELPHION

[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)
[My Account](#) | [Products](#)
[Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent](#)

The Delphion Integrated View

 Get Now:  [PDF](#) | [More choices...](#)

 Tools: Add to Work File: [Create new Wor](#)

 View: [Expand Details](#) | [INPADOC](#) | Jump to: [Top](#)  Go to: [Derwent](#)
 [Email](#)

 Title: **WO9814213A1: MITOCHONDRIAL MEMBRANE STABILIZER**[\[French\]](#)

 Derwent Title: Treating diseases associated with mitochondrial function anomalies - e.g. ischaemic diseases, by stabilising mitochondria using e.g. pyrrolidine derivatives [\[Derwent Record\]](#)

 Country: **WO** World Intellectual Property Organization (WIPO)

 Kind: **A1** Publ. of the Int. Appl. with Int. search report ¹

 Inventor: **YOSHII, Mitsunobu**; 5-5-306, Sakuragaoka 4-chome, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan
WATABE, Shigeo; Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo R & D Center, 16-13, Kita-kasai 1-chome, E, Japan

 Assignee: **DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.**, 14-10, Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103, Japan
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

 Published / Filed: **1998-04-09 / 1997-09-30**

 Application Number: **WO1997JP0003485**

 IPC Code: **A61K 45/00; A61K 31/40; A61K 31/47; A61K 31/505; C07D 207/27; C07D 207/273; C07D 239/28; C07D 217/26;**

 ECLA Code: **C07D207/26B2;**

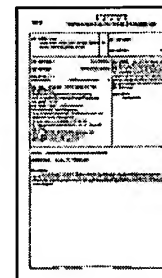
 Priority Number: 1996-10-01 **JP1996008260649**

 Abstract: A preventive and/or remedy for diseases caused by or accompanied with mitochondrial function anomalies, such as ischemic diseases, toxicosis and degenerative diseases, containing as the active ingredient a substance exhibiting the effect of stabilizing mitochondria by stabilizing the membrane potential thereof, such as 2,6-dimethylanilide of 2-oxo-1-pyrrolidinylacetic acid functioning as a benzodiazepine receptor antagonist. [\[French\]](#) [\[Japanese\]](#)


 Attorney, Agent or Firm: **IMAMURA, Masazumi**;

 INPADOC Legal Status: [Show legal status actions](#) Get Now: [Family Legal Status Report](#)

 Designated Country: AL AU BA BB BG BR CA CN CU CZ EE GE HU ID IL IS JP KR LC LK LR LT LV MG MK MN MX NO NZ PL RO SG SI SK SL TR TT UA US UZ VN YU, **European patent:** AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE, **OAPI patent:** BF BJ CF CG CI CM GA GN ML MR NE SN TD TG, **ARIPO patent:** GH KE LS MW SD SZ UG ZW, **Eurasian patent:** AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM

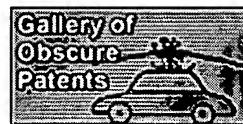
 Family: [Show 11 known family members](#)


Forward References: **Go to Result Set: Forward references (1)**

PDF	Patent	Pub.Date	Inventor	Assignee	Title
	US6399650	2002-06-04	Otomo; Eiichi	Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.	Method for improving disturbances of activities living after stroke

Other Abstract Info:

CHEMABS 128(23)279006M CHEMABS 128(23)279006M DERABS C1998-239857 DI C1998-239857



[Nominate this for the Gall](#)



© 1997-2004 Thomson

[Research Subscriptions](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Feedback](#)



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 45/00, 31/40, 31/47, 31/505, C07D 207/27, 207/273, 239/28, 217/26</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/14213</p> <p>(43) 国際公開日 1998年4月9日(09.04.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03485</p> <p>(22) 国際出願日 1997年9月30日(30.09.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/260649 1996年10月1日(01.10.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 吉井光信(YOSHII, Mitsunobu)[JP/JP] 〒156 東京都世田谷区桜丘四丁目5番5-306号 Tokyo, (JP) 渡部繁男(WATABE, Shigeo)[JP/JP] 〒134 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒103 東京都中央区八重洲一丁目8番12号 藤和八重洲一丁目ビル7階 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, ID, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーランア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: MITOCHONDRIAL MEMBRANE STABILIZER</p> <p>(54)発明の名称 ミトコンドリア膜安定化剤</p> <p>(57) Abstract A preventive and/or remedy for diseases caused by or accompanied with mitochondrial function anomalies, such as ischemic diseases, toxicosis and degenerative diseases, containing as the active ingredient a substance exhibiting the effect of stabilizing mitochondria by stabilizing the membrane potential thereof, such as 2,6-dimethylanilide of 2-oxo-1-pyrrolidinylacetic acid functioning as a benzodiazepine receptor antagonist.</p>		

(57) 要約

ミトコンドリアの膜電位を安定化させることによりミトコンドリアに対して安定化作用を有する物質（例えばベンゾジアゼピンレセプターアンタゴニストとして作用する2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 2,6-ジメチルアニリドなど）を有効成分として含み、ミトコンドリア機能異常に起因し、又はミトコンドリア機能異常を伴う疾患（例えば虚血性疾患、中毒症、及び変性疾患など）の予防及び／又は治療剤。

PCTに基づいて公開される国際出版のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SD	スーダン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

ミトコンドリア膜安定化剤

技術分野

本発明は、ミトコンドリアの機能異常に起因する、又はミトコンドリアの機能異常を伴う疾患の予防及び／又は治療剤に関するものである。

背景技術

細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) は、生理的条件下では重要な情報伝達物質として作用するが、ある濃度以上に増加すると細胞障害因子となりうることが知られている。特に、虚血時の神経系では、グルタミン酸の過剰によりその受容体 (NMDA 型) を介してカルシウムイオンが細胞内に流入し、神経壊死が誘発される (Choi, D. W., Trends in Neurosciences, 11, 465-469, 1988)。通常、細胞内にある濃度以上のカルシウムイオンが流入すると余剰のカルシウムイオンは小胞体とミトコンドリアに取り込まれ、細胞内のカルシウムイオン濃度は恒常的に維持される。

しかしながら、ミトコンドリア内に高濃度のカルシウムイオンが長期に蓄積されミトコンドリア内部の低酸素状態が慢性化すると、ミトコンドリアのエネルギー産生機能 (ATP 合成能) が低下し、細胞膜に存在する種々のイオンポンプが停止してしまう (Nicotera et al., Chem. Res. Toxicol., 3, 484-494, 1990; Zaiden et al., J. Neurochem., 63, 1812-1819, 1994)。また、カルシウムイオン流入状態が維持されると、細胞膜は脱分極し、このためにマグネシウムイオンにより抑制状態にある NMDA 型グルタミン酸受容体-イオンチャンネル複合体が脱抑制されて、さらにカルシウムイオンの流入が促進されるという悪循環をまねく。

ミトコンドリア内部に高濃度のカルシウムイオンが流入・蓄積している状態においてもミトコンドリアのエネルギー産生機能 (ATP 合成) を維持させることができれば、細胞膜に存在するカルシウムイオンポンプの機能が健全に保たれるので、細胞内に流入・蓄積するカルシウムイオン濃度を低下させることができ、その結

果、細胞の生理的な状態が回復する可能性がある。しかしながら、カルシウムイオンの流入時にミトコンドリアを活性化させることは下記の理由から実質的に困難であると考えられてきた。

すなわち、ミトコンドリア内では好気性解糖プロセス（TCA サイクル）によりエネルギーが産生されているが、このプロセス（電子伝達系）で水素イオン(H^+)が生じ、得られたエネルギーはこの水素イオンをミトコンドリア内部より外部へ輸送するために使われる。

そのために、ミトコンドリア内膜と外部には非常に高い電気化学ポテンシャル [①-150 mV 程度のミトコンドリア膜電位 (Ψ_m)、及び、②ミトコンドリア内膜を介する水素イオン(H^+) 濃度の差に由来する化学ポテンシャル] が発生しており (Loew et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 12579-12583, 1994)、この水素イオン(H^+) 能動輸送による高ポテンシャルエネルギーを基にしてATP が合成される (kagawa, Y., 細胞工学, 11, 3-11, 1992)。

一方、ミトコンドリア内部に正電荷のカルシウムイオンが流入すると、生理的条件下では、ミトコンドリア内部の ATPase により発生したエネルギーを用いて流入したカルシウムイオンがくみ出され、ミトコンドリア膜電位差が維持されるが、ATP 活性が低下するような病的条件下では、ATPase 活性が低下し、カルシウムイオンのくみ出しが不十分となり、そのためにミトコンドリア内部の電位がプラス方向に移動し、 Ψ_m が低下（電気ポテンシャルが減少）すると予想される。

このような病的状態（ミトコンドリア膜が脱分極した状態）では、仮に水素イオン(H^+) 濃度差に由来する化学ポテンシャルが存在するとしても、 Ψ_m の電気ポテンシャルの減少による電気化学ポテンシャルの低下が原因してATP 合成酵素の活性が抑制され、最終的にミトコンドリアでのATP 合成が停止してしまう。

種々の外的要因又は内的要因によってミトコンドリア膜の脱分極が引き起こされ、その脱分極が一因となってミトコンドリアの機能異常が生じる可能性が示唆されている。また、種々の疾患でミトコンドリアの機能異常が認められており、一部の疾患ではミトコンドリアの機能異常が重要な病因になっていると考えられている。例えば、虚血性脳疾患及び虚血性心疾患などの虚血性疾患、パーキンソ

ン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、及びミトコンドリア脳筋症などのミトコンドリア異常による変性疾患、並びに一酸化炭素などによる各種中毒症などでは、一般的にミトコンドリアの機能異常が認められる。種々の外的又は内的要因の作用からミトコンドリア膜を保護し、生理的な膜電位を維持することによりミトコンドリア膜を安定化する物質が提供されれば、これらの疾患の治療や予防に極めて有用であることが期待される。

発明の開示

本発明の目的は、種々の外的又は内的要因の作用からミトコンドリア膜を保護し、ミトコンドリア膜の脱分極を抑制ないし排除することによって、ミトコンドリア膜を安定化する作用を有する物質を提供することにある。本発明の別の目的は、ミトコンドリア膜を安定化させ、ミトコンドリア膜の脱分極を伴うミトコンドリアの機能異常を防止する作用を有する物質を提供することにある。また、本発明のさらに別の目的は、上記の作用を有する物質を有効成分として含み、ミトコンドリアの機能異常に起因する、又はミトコンドリアの機能異常を伴う疾患の予防及び／又は治療剤を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、ミトコンドリア膜の脱分極を抑制ないし排除することによってミトコンドリア膜を安定化する作用を有する物質が存在することを初めて確認した。本発明者らはさらに研究を行い、ミトコンドリア膜を安定化することによってミトコンドリア膜を外的要因又は内的要因による脱分極から保護することができること、及び／又はミトコンドリア膜の生理的な分極状態を維持ないし回復し、ミトコンドリアの生理的なエネルギー産生を維持ないし回復できることを見出した。また、このような作用を有する物質がミトコンドリア膜に存在するベンゾジアゼピンレセプターにアンタゴニストとして結合することにより、ミトコンドリア膜を不安定化するアゴニストの作用を抑制できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、ミトコンドリア膜に対する安定化作用を有する物質を有効

成分として含む、ミトコンドリア機能異常に起因する、又はミトコンドリア機能異常を伴う疾患の予防及び／又は治療剤を提供するものである。上記発明の好ましい態様によれば、ミトコンドリア膜に対する安定化作用がミトコンドリア膜の脱分極を抑制又は排除する作用である上記予防及び／又は治療剤；ミトコンドリア膜の脱分極が細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により惹起される上記予防及び／又は治療剤；ミトコンドリア膜に対する安定化作用が、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇時においてミトコンドリアのATP産生能を生理的な状態に維持ないしは回復させる作用である上記予防及び／又は治療剤；並びに、該疾患が、虚血性疾患、中毒症、及び変性疾患からなる群から選ばれる上記予防及び／又は治療剤が提供される。また、該物質がミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプターアンタゴニストである上記予防及び／又は治療剤が提供される。

上記発明の好ましい態様によれば、虚血性疾患が、脳神経系若しくは脳血管系の虚血性障害、虚血性心疾患、腎不全、又は肝不全である上記予防及び／又は治療剤；変性疾患が、ミトコンドリア酵素活性異常、ミトコンドリア遺伝子変異症、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ミトコンドリア脳筋症、又はニーマン・ピック病である上記予防及び／又は治療剤；並びに、中毒症が、ガス中毒、アルコール中毒、薬物中毒、農薬中毒、重金属中毒、又は天然の動物若しくは植物の毒素による中毒症である上記予防及び／又は治療剤が提供される。

別の観点からは、本発明により、ミトコンドリア膜を安定化する作用を有する物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む、ミトコンドリア機能異常に起因する、又はミトコンドリア機能異常を伴う疾患の予防及び／又は治療方法が提供される。

さらに別の観点からは、本発明により、ミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプターアンタゴニストを有効成分として含むミトコンドリアの膜安定化剤；並びに、ミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプターアンタゴニストを有効成分として含む、ミトコンドリア機能異常に起因する、又はミトコンドリア機能異常を伴う疾患の予防及び／又は治療剤が提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼすRo5-4864の作用を示す図である。

第2図は、ミトコンドリア膜電位に及ぼすRo5-4864の作用を示す図である。

第3図は、ブラジキニン処理及びカフェイン処理を施したNG108-15神経細胞において、細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼすRo5-4864の作用を示した図である。

第4図は、ブラジキニン処理及びカフェイン処理を施したNG108-15神経細胞において、ミトコンドリア膜電位に及ぼすRo5-4864の作用を示した図である。

第5図は、本発明の医薬（ネフィラセタム）がRo5-4864による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を阻害することを示した図である。

第6図は、本発明の医薬（ネフィラセタム）がミトコンドリア膜に対するRo5-4864の脱分極作用を阻害することを示した図である。

第7図は、本発明の医薬（PK11195）がミトコンドリア膜に対するRo5-4864の脱分極作用を阻害することを示しており、ミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプター（MBR）の活性化によりミトコンドリア膜脱分極と細胞内 Ca^{2+} 濃度とが連動している結果を示す図である。

第8図は、本発明の医薬（PK11195）がミトコンドリア膜電位に及ぼすRo5-4864の作用を阻害することを示しており、本発明の医薬とRo5-4864とがMBRに対して競合的に作用している結果を示す図である。

第9図は、本発明の医薬（NCS-1044-90）で処理した細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼすRo5-4864の影響を示した図である。

第10図は、NCS-1044-90 処理細胞における細胞内ミトコンドリア膜電位に及ぼすRo5-4864の影響を示した図である。

発明の実施するための最良の形態

本発明の医薬は、ミトコンドリア膜に作用して膜（特に内膜）を安定化する作用を有している。その結果として、本発明の医薬は、種々の外的要因（中毒性物質への被曝など）又は内的要因（遺伝子の異常発現などによる細胞膜構成成分の

異常など)による脱分極作用などからミトコンドリア膜を保護するとともに、ミトコンドリア膜の生理的な分極状態を維持ないし回復して、ミトコンドリアでの生理的なエネルギー産生を維持ないし回復する作用を有している。本明細書において「ミトコンドリアの機能異常」という場合には、上記のようなエネルギー産生能の低下(機能低下)を含めて、ミトコンドリアの機能に実質的ななんらかの異常が生じているものを全て包含する概念として用いる。また、本明細書において「生理的」という用語は、正常な生命活動が維持されている平均的な細胞内環境と実質的に同じ状態にあることを意味している。

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、外的又は内的要因により細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇すると、ミトコンドリア内部のカルシウムイオン濃度も高まり、ミトコンドリア膜の脱分極が生じてATP産生能が低下する。本発明の医薬は、特に細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇した場合においてミトコンドリア膜を安定化する作用を有しており、膜の脱分極を実質的に完全に抑制し、又はその脱分極を抑制するとともに、ミトコンドリアのATP産生能を生理的な状態に維持ないしは回復させる。

また、いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明の医薬は、ミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプター(MBR)に結合することができ、このレセプターに結合してミトコンドリア膜電位を不安定化させるMBRアゴニスト[例えば7-クロロ-5-(4-クロロフェニル)-1,3-ジヒドロ-1-メチル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン:TIPS, December, pp.506-511, 1986]に対して競合的アンタゴニストとして作用する。本発明の医薬は、MBRに対するアンタゴニスト作用によってミトコンドリアの膜を安定化させ、上記の生理作用を発揮するものと考えられる。

従って、本発明の医薬は、(a)ミトコンドリア膜を安定化する作用によって特徴付けられるものであり、この安定化作用に基づいて、(b)ミトコンドリア膜を外部的要因又は内部的要因による脱分極作用から保護し；及び／又は(c)ミトコンドリア膜の生理的な分極状態を維持ないし回復して、ミトコンドリアの生理的なエネルギー産生を維持ないし回復する作用を有することを特徴としている。従って、本発明の医薬は、特定の化学構造の物質に限定されることなく、上記の生理学的

特徴を有する物質を含む医薬はいずれも本発明の範囲に包含されることを理解すべきである。なお、上記の生理学的特徴の確認手段は本明細書の実施例に詳細に記載されている。

また、本発明の医薬はミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプターアンタゴニストを有効成分として含み、ミトコンドリア膜を安定化することによって、ミトコンドリアの機能異常に起因し、又はミトコンドリアの機能異常を伴う疾患の予防及び／又は治療を有効に達成することができる。ミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプター・アンタゴニストとしての作用の確認手段も本明細書の実施例に具体的に説明されている。

ミトコンドリアの機能異常に起因し、又はミトコンドリアの機能異常を伴う疾患としては、例えば、肝臓、心臓、脳、又は腎臓などの臓器やそれらを支配する血管系の虚血性疾患、より具体的には、感覚・運動障害、言語障害、記憶障害、痴呆、痙攣発作、精神障害などの症状の1又は2以上を伴う血管性脳障害などの脳神経系の虚血性障害；心筋梗塞などの虚血性心疾患；腎不全などの虚血性腎障害；肝不全などの虚血性肝障害はその代表的な疾患である。これらの疾患には血圧低下、低酸素症、及び薬物中毒により惹起されたものも含まれる。他の疾患の例として、ミトコンドリア酵素異常、ミトコンドリア遺伝子変異などのミトコンドリア異常による変性疾患（Shigenaga et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91, 10771-10778, 1994; Tanaka, M., et al., 内科, 77, 881-887, 1996）、及び各種中毒症を挙げることができる。

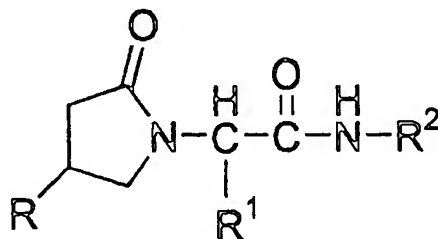
ミトコンドリアの機能異常の関与が証明ないし示唆されている変性疾患としては、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ミトコンドリア脳筋症（Ohnishi, H. et al., 脳神経, 44, 259-264, 1992）、ニーマン・ピック病などを挙げることができる。中毒症の例としては、一酸化炭素ガス、二酸化炭素ガス、シアンガスなどによるガス中毒、アルコール中毒、薬物中毒、ピレスロイド系農薬や有機リン系農薬などによる農薬中毒、重金属中毒、又はフグ毒やキノコ毒などの天然の動物・植物の毒素による中毒症を挙げることができる。

虚血性疾患や各種中毒症などにおいては、細胞内にカルシウムイオンが流入す

ることが知られている (Zaidan, E. et al., J. Neurochem., 63, pp. 1812-1819, 1994)。一方、ミトコンドリアにおけるATP 合成は、ミトコンドリア内外水素イオン(H^+) 濃度の電気化学的ポテンシャルの差に依存することが知られている (Michell, P., Science, 206, 1148, 1979; Michell, P., FEBS Lett., 43, 184, 1974)。従って、このようなミトコンドリア内へのカルシウムイオンの流入がミトコンドリア膜の脱分極をもたらすことが予測されたが、本発明者は本発明の完成に際してこの事実を実験的に証明した。

また、この事実を基にすると、前記の病的条件下におけるミトコンドリア内へのカルシウムイオンの流入によりミトコンドリア膜が脱分極し、ミトコンドリアでのエネルギー産生が低下することが予測される。従って、生理的濃度よりも高い細胞内カルシウムイオン濃度を伴う疾患、特に、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により引き起こされるミトコンドリア膜の脱分極を伴う疾患は、本発明の医薬の特に好適な対象となる。

本発明の医薬の有効成分として好適な化合物群の第一の例としては、下記の式：



で表される 2-オキソ-1-ピロリジニルアルキルカルボン酸アミド化合物を挙げることができる。

式中、R は水素原子または水酸基を示し、 R^1 は水素原子またはメチル基を示し、 R^2 はピリジル基又は 1~3 個の同一又は異なる置換基で置換された置換フェニル基を示す。フェニル基上の置換基としては、ハロゲン原子（本明細書において「ハロゲン原子」という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、トリフルオロメチル基、ニトロ基、アセチル基、1~4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、1~4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシル基、1~7 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖の

アルキルメルカプト基、一般式： $-S-(CH_2)_n-CH(R^3)(R^4)$ 〔式中の n は1又は2を示し、 R^3 は水素原子又はメチル基を示し、 R^4 は水酸基又は一般式： $-N(R^8)(R^9)$ （式中の R^8 は水素原子又はメチル基を示し、 R^9 はメチル基、ベンジル基、又は置換ベンジル基を示し、あるいは R^8 及び R^9 が一緒になって式中の窒素原子と共に置換ピロリジン環を示す）で表されるアミノ基を示す〕で表される置換アルキルメルカプト基、次の一般式： $-SO_2R^5$ （式中の R^5 はアミノ基又は1～3個の炭素原子を有するアルキル基を示す）で表されるスルホニル基、及び次の一般式： $-COO(CH_2)_2-N(R^6)(R^7)$ （式中の R^6 及び R^7 はそれぞれ独立に水素原子、メチル基、又はエチル基を示す）で表されるアミノエトキシカルボニル基からなる群から選ばれる。

フェニル基の置換基の具体例としては、塩素原子又はフッ素原子などのハロゲン原子；メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 sec -ブチル基、又は n -ブチル基などのアルキル基；メトキシ基又はイソプロポキシ基などのアルコキシ基；メチルメルカプト基、 n -プロピルメルカプト基、イソプロピルメルカプト基、 sec -ブチルメルカプト基、又は n -ヘプチルメルカプト基などのアルキルメルカプト基；2-ヒドロキシプロピルメルカプト基、2-(N,N -ジメチルアミノ)-プロピルメルカプト基、又は2-(N -メチル- N -ベンジルアミノ)-エチルメルカプト基などの置換アルキルメルカプト基；一般式： $-S-(CH_2)_n-CH(R^3)-N(R^8)(R^9)$ において式中 R^9 で表される置換ベンジル基がメトキシ基で置換されたベンジル基である、例えば2- N -メチル- N -(3,4-ジメトキシベンジル)-アミノ)-エチルメルカプト基などの N -メチル- N -ベンジルアミノアルキルメルカプト基；一般式： $-S-(CH_2)_n-CH(R^3)-N(R^8)(R^9)$ において R^8 及び R^9 が示す置換ピロリジン環が2-オキソ基で置換されたものである、例えば2-(2-オキソ-1-ピロリジニル)-エチルメルカプト基などの1-ピロリジニルアルキルメルカプト基；及び2-(N,N -ジエチルアミノ)-エトキシカルボニル基などを挙げることができる。 R^2 で表されるピリジル基は好適には未置換のものを用いることができ、2-ピリジル基、3-ピリジル基、又は4-ピリジル基のいずれを用いてもよい。

本発明の医薬の有効成分として好適な化合物群の第二の例として、

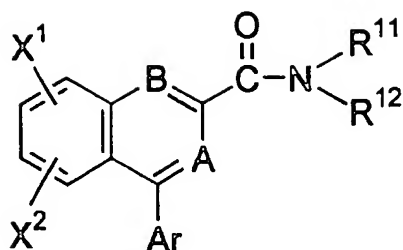
- (1) 2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 2,6-ジメチルアニリド；
- (2) 4-ヒドロキシ-2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 2,6-ジエチルアニリド；

- (3) 4-ヒドロキシ-2- オキソ-1- ピロリジニル酢酸 2, 6- ジメチルアニリド ;
- (4) 2-[2- オキソ- ピロリジニル] プロピオン酸 N-3- ピリジニルアミド ;
- (5) 2-オキソ-1- ピロリジニル酢酸 4- イソプロピルメルカプトアニリド ;
- (6) 2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-1-プロピオン酸 4-(2-ブチルメルカプト)-アニリド ;
- (7) 2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-4- イソプロピルアニリド ;
- (8) 2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-2, 4- ジメチルアニリド ;
- (9) 2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-2, 4, 6- トリメチルアニリド ;
- (10) 2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-2- メトキシ-5- メチルアニリド ;
- (11) 2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-2, 6- ジクロロアニリド ;
- (12) 2-ピロリドン- アセタミド ;
- (13) 1-アニソイル-2- ピロリジノン ; 及び
- (14) 4-ヒドロキシ-2- オキソ-1- ピロリジンアセタミド

などからなる化合物群を挙げることができる。上記の具体的化合物のほか、特公平3-46466 号公報の第10～19頁の表3に開示された化合物も第二の化合物群に含まれる代表的化合物である。

上記の第二の化合物群に属する化合物のうち特に好適な化合物は、2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 2, 6- ジメチルアニリド[N-(2, 6- ジメチルフェニル)-2-(2-オキソ-1-ピロリジニル) アセタミド, 一般名: ネフィラセタム] ; 2-ピロリドン- アセタミド ; 1-アニソイル-2- ピロリジノン ; 及び4-ヒドロキシ-2- オキソ-1- ピロリジンアセタミドである。

本発明の医薬の有効成分として好適な化合物群の第三の例としては、下記の式 :



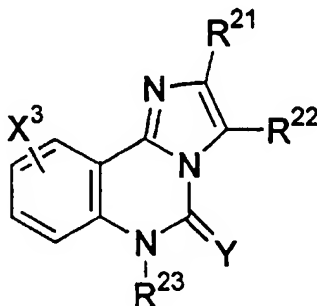
で表される化合物群を挙げることができる。

式中、 R^{11} 及び R^{12} はそれぞれ独立に 1～6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、3～7 個の炭素原子を有するシクロアルキル基、アルキル部分の炭素原子数が 1～3 個であるフェニルアルキル基若しくはシクロアルキル置換アルキル基、又は 3～6 個の炭素原子を有するアルケニル基若しくはアルキニル基（ただし、二重結合又は三重結合は窒素原子に関して 1-2 位に位置しない）を示し；A および B はそれぞれ独立に N 又は CH を示し； X^1 及び X^2 はそれぞれ独立にハロゲン原子、1～3 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、1～3 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基、ニトロ基、又はトリフルオロメチル基を示し；Ar はフェニル基、ピリジル基、チエニル基、又は置換フェニル基（フェニル基上の置換基は、ハロゲン原子、1～4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、1～4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基、1～4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキルチオ基、トリフルオロメチル基、及びニトロ基からなる群から選ばれた 1 個又は 2 個の置換基である）を示す。

この化合物群に含まれる化合物のうち、 X^1 及び X^2 が水素原子であり、Ar が置換フェニル基であり、B が CH であり、A が N であり、 R^{11} 及び R^{12} がそれぞれ独立に 1～6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基である化合物が好ましい。さらに好ましい化合物として、 X^1 及び X^2 が水素原子であり、Ar がクロロフェニル基であり、B が CH であり、A が N であり、 R^{11} がメチル基であり、 R^{12} が 1～6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基である化合物を挙げることができる。特に好ましい化合物は、N-メチル-N-(1-メチルプロピル)-(2-クロロフェニル)イソキノリン-3-カルボキサミド、並びにその光学活性体である

であるN-メチル-N-(1-(S)-メチルプロピル)-(2-クロロフェニル)イソキノリン-3-カルボキサミド及びN-メチル-N-(1-(R)-メチルプロピル)-(2-クロロフェニル)イソキノリン-3-カルボキサミドである。これらの化合物は特開昭58-201756号公報の実施例44及び45に記載されている。

本発明の医薬の有効成分として好適な化合物群の第四の例としては、下記の式：



で表される化合物群を挙げることができる。

式中、 R^{21} は未置換フェニル基、置換フェニル基（フェニル基上の置換基は、ハロゲン原子、1～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、及び1～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基からなる群から選ばれる1個又は2個の置換基である）、又はチエニル基を示し； R^{22} は水素原子又はハロゲン原子、置換基を有していてもよい1～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基（置換基はアミノ基、アルキルアミノ基、及びジアルキルアミノ基から選ばれる）を示し； R^{23} は $(R^{24})(R^{25})N-CO-Q-$ で表される基（式中、 Q は1～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキレン基であり、 R^{24} 及び R^{25} はそれぞれ独立に1～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、未置換フェニル基、又は置換フェニル基（フェニル基上の置換基は、ハロゲン原子、1～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、及び1～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基からなる群から選ばれる1個又は2個の置換基である）を示し； X^3 は水素原子又はハロゲン原子を示し； Y は酸素原子又は硫黄原子を示す。

この化合物群に含まれる化合物のうち、 R^{21} が置換フェニル基（フェニル基上の置換基は、ハロゲン原子、1～6個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキ

ル基、及び 1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基からなる群から選ばれる 1 個又は 2 個の置換基である) であり; R^{22} がハロゲン原子であり; R^{23} が $(R^{24})(R^{25})N-CO-Q-$ で表される基 (式中、Q は 1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキレン基であり、 R^{24} が 1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基であり、 R^{25} が未置換フェニル基又は置換フェニル基 (フェニル基上の置換基は、ハロゲン原子、1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、及び 1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基からなる群から選ばれる 1 個又は 2 個の置換基である) であり; X^3 が水素原子であり; Y が酸素原子である化合物が好ましい。また、 R^{21} がクロロフェニル基であり; R^{22} が臭素原子であり; R^{23} が $(R^{24})(R^{25})N-CO-Q-$ で表される基 (式中、Q は 1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキレン基であり、 R^{24} が 1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基であり、 R^{25} が未置換フェニル基であり; X^3 が水素原子であり; Y が酸素原子である化合物がより好ましい。

特に好ましい化合物として、2-(3-クロロフェニル)-3-ブromo-6-(N-メチル-N-フェニルアセトアミド)-5-オキソ-5,6-ジヒドロイミダゾ[1,2-c]キナゾリンを挙げることができる。この化合物は、特開平4-217682号公報の実施例中に42番目の化合物として記載されている。

上記に例示した化合物群に含まれる化合物は、特開昭56-2960号公報、特開昭61-280470号公報、特開平4-160496号公報、特開昭58-201756号公報、特開平4-217682号公報などに記載されている方法に従って容易に製造可能である。なお、特公平3-46466号公報に開示された上記ピロリジニルアセトアミド誘導体については、脳機能改善作用 (特公昭62-5404号公報)、アルツハイマー型痴呆改善作用 (特開平5-163144号公報)、脳血管性痴呆改善作用 (特開平5-163145号公報)、及びE1マウスでの抗けいれん作用 (中本ら、第17回日本神経科学大会、1993年12月7日~9日、名古屋市、プログラム抄録集第84頁、演題番号P1A20)などの生物学的作用が知られている。また、この化合物が、ミトコンドリア膜に存在するミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプター (MBR) に対して親和性を有することが知られているが (Neurosci. Res. Suppl. 17, S88, 1992, 2-71)、この化合物のミトコンドリア膜

電位に対する作用は従来知られていない。

本発明の医薬の有効成分としては、遊離形態の化合物又は生理学的に許容される塩の形態の化合物のいずれを用いてもよい。また、その任意の水和物若しくは溶媒和物を用いることもできる。生理学的に許容される塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の鉱酸塩、あるいは、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、マンデル酸塩、メタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、10-カンファースルホン酸塩等の有機酸塩などの酸付加塩を挙げることができる。本発明の医薬の有効成分として用いる化合物が1又は2以上の不斉炭素を有する場合には、それぞれの不斉炭素の立体配置は特に限定されず、任意の光学活性体、光学異性体の任意の混合物、又はラセミ体のいずれを用いてもよい。また、2個以上の不斉炭素に基づくジアステレオ異性体の任意の混合物を用いてもよい。

本発明の医薬の投与形態は特に制限されず、経口的・非経口的に投与することができる。本発明の医薬としては、有効成分である化合物、例えば上記式(I)の化合物をそのまま用いてもよいが、有効成分の化合物と薬理学的及び製剤学的に許容しうる製剤用添加物とを含む医薬組成物の形態で提供されることが好ましい。薬理学的及び製剤学的に許容しうる添加物としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし溶解補助剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を用いることができる。経口投与に適する製剤の例としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、液剤、又はシロップ剤等を挙げることができる。非経口投与に適する製剤としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、吸入剤、又は貼付剤等を挙げることができる。なお、本発明の医薬には1種又は2種以上の有効成分を配合することが可能である。

本発明の医薬の投与量は特に限定されず、治療又は予防の目的、疾患の種類、患者の年齢や症状、投与経路などの種々の条件に応じて適宜の投与量を選択することが可能である。一般的には、経口投与の場合に成人一日あたり約 10 mg～1,

000 mg程度、好ましくは、約 60 mg～900 mg程度である。なお、本発明に特に好適に用いられる2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 2,6-ジメチルアニリド[一般名：ネフィラセタム]の急性毒性は 2,005 mg/kg (雄性マウス, p.o.) であり、安全性が高いことが証明されている (特開平5-163144号公報)。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。実施例の試験方法は、特に言及のない場合は、ヘールら (Hare, M.F., et. al., JPET, 266, pp.1626-1635, 1993) の方法に従って行った。また、実施例中、「ネフィラセタム」は2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 2,6-ジメチルアニリドを示し、「Ro5-4864」はミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプター・アゴニスト [7-クロロ-5-(4-クロロフェニル)-1,3-ジヒドロ-1-メチル-2H-1,4-ベンゾジアゼピン-2-オン: TIPS, December, pp.506-511, 1986] を示す。

例1: 細胞内Ca²⁺濃度の測定

細胞内Ca²⁺濃度に及ぼすRo5-4864の添加の影響を検討した。培養細胞 (NG108-15細胞: 神経細胞×神経膠細胞ハイブリッド) を DMEM 培地を用いて培養し、さらにカバーガラスを装着せたフレキシバームディスク (Heraeus Biotechnology社製) 内で培養して以下の実験に用いた。培養したNG108-15細胞に、Ro5-4864を50 mMの濃度になるように添加した。蛍光試薬 fura2-AM [1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester, 同仁化学研究所製] を DMSO (Dimethylsulfoxide, 半井化学製) に溶解して 1 mM 溶液を作製し、次にこの溶液をHBS(Herpes-saline 液, 組成: NaCl: 130 mM; KCl: 5.4 mM; CaCl₂: 1.8 mM; MgSO₄: 0.8 mM; D-glucose: 20 mM; Na⁺-HEPES: 20 mM, pH 7.3) で200倍に希釈して蛍光試薬溶液とした (fura2-AMの最終濃度: 5 μM)。

細胞内Ca²⁺濃度の測定は、NG108-15細胞を培養したシャーレ (Petri dish) 内

の培養液を除き、HBSで2回洗浄し、上記により調製した5 μ M のfura2-AM溶液を培養細胞に添加し、炭酸ガスインキュベーター内に30分間静置し、その後、添加したfura2-AM溶液を取り除くためにHBSで5回洗浄した。最後にフレキシパームにHBS 1mlを添加し、ARGUS-50/CA(浜松ホトニクス社製)により細胞内Ca²⁺濃度を測定した。この測定法は、fura-2がロードされた培養細胞において、340nmの励起波長で発するCa²⁺結合型fura-2の蛍光と380nmの励起波長で発するCa²⁺遊離型fura-2の蛍光とを一定時間毎にペアで測定し、その相対比(蛍光強度の比)をもって、細胞内Ca²⁺動態(濃度)を解析する方法である。細胞内カルシウムイオンとfura2-AMとの結合による340 nm励起蛍光の増大と、380 nm励起蛍光の減少を画像記録し、蛍光画像間の蛍光強度の比を求めた。第1図に細胞内Ca²⁺濃度に及ぼすRo5-4864の効果を示した。この結果によれば、Ro5-4864の添加により細胞内Ca²⁺濃度が急激に上昇することが明らかである。

例2：ミトコンドリア膜電位の測定

ローダミン123 (2-[6-Amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl]-benzoic acid methylester, Sigma 社製)をHBSで溶解および希釈し、最終濃度10 μ Mの溶液を調製した。ペトリ皿内に培養したNG108-15細胞の培養液を除きHBSで2回洗浄した。ローダミン123溶液を再度攪拌した後、培養細胞に添加して細胞を炭酸ガスインキュベーター内に10分間静置した。その後、添加したローダミン123溶液を取り除くためにHBSで5回洗浄した。つぎに、この細胞を含むフレキシパームディスク内にHBS (1 ml)を添加し、再び炭酸ガスインキュベーター内で10分間静置した。最後に細胞をHBSで1回洗浄して実験に供した。細胞内Ca²⁺濃度の測定にはARGUS-50/CA(浜松ホトニクス社製)を使用した。ミトコンドリア膜電位の測定の実験は、培養したNG108-15神経細胞にRo5-4864 (50 μ M)を添加し、以後経時的にARGUS-50/CAにより電位変化を測定した。第2図に示す結果から、Ro5-4864の添加によりミトコンドリアの膜電位は顕著に減少し、膜の脱分極が生じることが判明した。図中、縦軸は第1図と同様に蛍光強度の比を示しているが、この実験では、初めの画像から蛍光強度を記録しておき、それを基準(ratio=1.0)としてそれ以降に観測され

る画像の蛍光強度の比を縦軸に示した。

細胞内の Ca^{2+} 調節に関与するオルガネラとして小胞体が知られているが、小胞体からの Ca^{2+} 放出機構として、イノシトール三リン酸による Ca^{2+} 放出（刺激薬：ブラジキニン(BK)）、 Ca^{2+} 誘発性の Ca^{2+} 放出（刺激薬：カフェイン(Caff)）の2つが知られている。例1により観測されたRo5-4864の添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と例2で観測されたミトコンドリア膜電位の減少との関連を調べるために、ブラジキニン及びカフェイン処理により小胞体に由来する細胞内 Ca^{2+} を枯渇させて同様の実験を行い、例1で観測された Ca^{2+} がミトコンドリア内部に蓄積されていた Ca^{2+} であるか否かを検討した。例1に記載した方法と同様な方法により、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。

例3：ブラジキニン及びカフェイン処理細胞におけるRo5-4864の影響

第3図は、NG108-15神経細胞にブラジキニン処理及びカフェイン処理した細胞において、細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼすRo5-4864の効果を示した図である。はじめに、受容体を介して小胞体から細胞内へ Ca^{2+} を遊離させることで知られているブラジキニン(BK 1 μM)を適用すると顕著な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された。続いてカフェイン(Caff/10 μM)を適用し、続いて第二回目のBKを適用をしたが、これらのいずれによっても細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は認められなかった。これは、第一回目のBKにより小胞体に由来する細胞内 Ca^{2+} が枯渇したためであると考えられる。この条件下で Ro5-4864(50 μM)を適用したところ細胞内 Ca^{2+} 濃度は顕著に上昇した。ブラジキニンは、細胞内 Ca^{2+} のもうひとつの貯蔵部位であるミトコンドリアに対しては作用しないものと考えられている。従って、Ro5-4864による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はミトコンドリアに由来するものであることが示された。

例2と同様の方法によりミトコンドリア膜電位を測定した。カフェイン(10 μM)およびブラジキニン(1 μM)を適用してもミトコンドリアの膜電位に変化は認められなかったが、Ro5-4864(50 μM)を適用したところ顕著なミトコンドリア膜電位の低下が認められ、ミトコンドリア膜が脱分極していることが確認された（第4図）。

例4：ネフィラセタム処理細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼすRo5-4864の影響

Ro5-4864 (25 μM)を適用して細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を確認した(第5図：最初のピーク)。上記の反応が起きることを確認した後、その細胞を洗浄し、さらに本発明の医薬としてネフィラセタム (50 μM)を適用したところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度に変化は認められず、ネフィラセタム存在下で Ro5-4864 (25 μM)を添加したところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度はほとんど変化しなかった(第5図)。この結果は、本発明の医薬が Ro5-4864 (25 μM)による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を阻害することを示している。

例5：ネフィラセタム処理細胞におけるミトコンドリア膜電位に及ぼすRo5-4864の影響

ミトコンドリア膜電位に及ぼす本発明の医薬の作用を例2と同様の方法により検討した。はじめに、ネフィラセタム (50 μM)を適用したところミトコンドリアの膜電位には何ら変化が認められなかった。さらに、ネフィラセタムの存在下で Ro5-4864 (25 μM)を適用したところ、ミトコンドリアの膜電位にはほとんど変化が認められなかった(第6図)。この結果は、Ro5-4864 (25 μM)のミトコンドリア膜に対する脱分極作用を本発明の医薬が阻害していることを示唆している。同様な実験においてさらに高濃度のRo5-4864 (50 μM)を適用すると、弱いながらもミトコンドリア膜脱分極作用が認められた(第6図)。

例6：PK11195 処理細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼすRo5-4864の影響

特開昭58-201756 号公報の実施例45に記載された方法と同様にして、N-メチル-N-(1-メチルプロピル)-(2-クロロフェニル)イソキノリン-3-カルボキサミド (PK11195, ラセミ体)を製造した。m.p. 133-134°C (CHCl_3 -EtOH)、Anal. Calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_2$ C, 71.48%; H, 6.00%; N, 7.94% Found C, 71.19%; H, 5.94%; N, 8.06%

Ro5-4864 (50 μM)を適用して細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を確認した(第7図：最初のピーク)。その後、PK11195 (20 μM)を前処置した後にRo5-4864を適用したとこ

る Ca^{2+} 濃度の上昇作用が抑制された。この結果は、PK11195 によるMBR（ミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプター）の活性化によってミトコンドリア膜脱分極作用と細胞内 Ca^{2+} 濃度とが連動していることを示している。

例7：PK11195 処理細胞におけるミトコンドリア膜電位に及ぼすRo5-4864の影響

ミトコンドリア膜電位に及ぼす本発明の医薬の作用を例2と同様の方法により検討した。はじめに PK11195 (20 μM)を適用したところミトコンドリアの膜電位にはなんら変化が認められなかった。さらに PK11195 (20 μM)の存在下でRo5-4864 (50 μM)を適用したところ、ミトコンドリア膜電位にはほとんど影響を与えなかった。しかしながら、その後、Ro5-4864の投与を繰り返すと脱分極が促進されてミトコンドリア膜電位が上昇した。この結果は、本発明の医薬とRo5-4864がMBR において競合的に作用している可能性を示唆している（第8図）。

例8：NCS-1044-90 処理細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼすRo5-4864の影響

特開平4-217682号公報の実施例42に示された方法と同様にして、2-(3-クロロフェニル)-3-ブromo-6-(N-メチル-N-フェニルアセトアミド)-5-オキソ-5,6-ジヒドロイミダゾ[1,2-c]キナゾリン (NCS-1044-90)を製造した。m. p. 225-227 °C (Et₂O)、Anal. Calcd. for C₂₅H₁₈BrClN₄O₂ C, 57.55%; H, 3.48%; N, 10.74% Found C, 57.93%; H, 3.53%; N, 10.91%

NCS-1044-90 (10 μM)を前投与した細胞に Ro5-4864 (100 μM)を適用して細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を検討したところ、Ro5-4864 の添加後にも細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は極めてわずかに認められたのみであった（第9図）。

例9：NCS-1044-90 処理細胞における細胞内ミトコンドリア膜電位に及ぼすRo5-4864の影響

NCS-1044-90 (10 μM)の処理により細胞内ミトコンドリア膜電位には変化は認められなかった。NCS-1044-90 (10 μM)の処理細胞にRo5-4864 (50 μM)を投与した場合には、細胞内ミトコンドリア膜電位の上昇は極めてわずかに認められたにす

ぎなかったが、さらに Ro5-4864 (100 μ M) で処理すると、膜電位の若干の穏やかな上昇が認められた (第10図)。

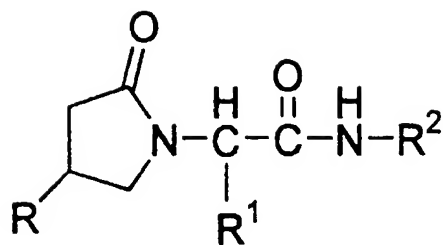
産業上の利用可能性

本発明の医薬はミトコンドリア膜を安定化させ、ミトコンドリア膜の脱分極などのミトコンドリア膜の不安定化により惹起されるミトコンドリアの機能異常を防止する作用を有しており、ミトコンドリアの機能異常に起因する、又はミトコンドリアの機能異常を伴う虚血性疾患や中毒症などの疾患の予防及び／又は治療剤の有効成分として有用である。

請 求 の 範 囲

1. ミトコンドリア膜に対する安定化作用を有する物質を有効成分として含む、ミトコンドリア機能異常に起因する、又はミトコンドリア機能異常を伴う疾患の予防及び／又は治療剤。
2. ミトコンドリア膜に対する安定化作用がミトコンドリア膜の脱分極を抑制又は排除する作用である、請求の範囲第1項に記載の予防及び／又は治療剤。
3. ミトコンドリア膜の脱分極が細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により惹起されるものである、請求の範囲第2項に記載の予防及び／又は治療剤。
4. 細胞内カルシウムイオン濃度の上昇時においてミトコンドリアのATP産生能を生理的な状態に維持ないしは回復させるミトコンドリア膜に対する安定化作用を有する物質を有効成分として含む、ミトコンドリア機能異常に起因する、又はミトコンドリア機能異常を伴う疾患の予防及び／又は治療剤。
5. ミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプターアンタゴニストを有効成分として含む、ミトコンドリア機能異常に起因する、又はミトコンドリア機能異常を伴う疾患の予防及び／又は治療剤。
6. 疾患が、虚血性疾患、中毒症、及び変性疾患からなる群から選ばれる請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の予防及び／又は治療剤。
7. 虚血性疾患が、脳神経系若しくは脳血管系の虚血性障害、虚血性心疾患、腎不全、又は肝不全である請求の範囲第6項に記載の予防及び／又は治療剤。
8. 変性疾患が、ミトコンドリア酵素異常、ミトコンドリア遺伝子変異症、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ミトコンドリア脳筋症、又はニーマン・ピック病である請求の範囲第6項に記載の予防及び／又は治療剤。
9. 中毒症が、ガス中毒、アルコール中毒、薬物中毒、農薬中毒、重金属中毒、又は天然の動物若しくは植物の毒素による中毒症である請求の範囲第6項に記載の予防及び／又は治療剤。
10. 疾患が細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を伴う疾患である、請求の範囲第6項ないし第9項のいずれか1項に記載の予防及び／又は治療剤。

11. 下記の式：



〔式中、R は水素原子または水酸基を示し、R¹は水素原子またはメチル基を示し、R²はピリジル基又は 1～3 個の同一又は異なる置換基で置換された置換フェニル基を示す。フェニル基上の置換基としては、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基、アセチル基、1～4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、1～4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシル基、1～7 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキルメルカプト基、一般式： $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}(\text{R}^3)(\text{R}^4)$ 〔式中のn は 1 又は 2 を示し、R³は水素原子又はメチル基を示し、R⁴は水酸基又は一般式： $-\text{N}(\text{R}^8)(\text{R}^9)$ （式中のR⁸は水素原子又はメチル基を示し、R⁹はメチル基、ベンジル基、又は置換ベンジル基を示し、あるいはR⁸及びR⁹が一緒になって式中の窒素原子と共に置換ピロリジン環を示す）で表されるアミノ基を示す〕で表される置換アルキルメルカプト基、次の一般式： $-\text{SO}_2\text{R}^5$ （式中のR⁵はアミノ基又は 1～3 個の炭素原子を有するアルキル基を示す）で表されるスルホニル基、及び次の一般式： $-\text{COO}(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{R}^6)(\text{R}^7)$ （式中のR⁶及びR⁷はそれぞれ独立に水素原子、メチル基、又はエチル基を示す）で表されるアミノエトキシカルボニル基からなる群から選ばれる〕で表される化合物を有効成分として含む請求の範囲第 1 項ないし第 10 項のいずれか 1 項に記載の予防及び／又は治療剤。

12. 下記の化合物：

- 2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 2,6-ジメチルアニリド；
- 4-ヒドロキシ-2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 2,6-ジエチルアニリド；
- 4-ヒドロキシ-2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 2,6-ジメチルアニリド；
- 2-[2-オキソ-ピロリジニル]プロピオン酸 N-3-ピリジニルアミド；
- 2-オキソ-1-ピロリジニル酢酸 4-イソプロピルメルカプトアニリド；

2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-1-プロピオン酸 4-(2-ブチルメルカプト)-アニリ
ド；

2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-4- イソプロピルアニリド；

2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-2, 4- ジメチルアニリド；

2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-2, 4, 6- トリメチルアニリド；

2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-2- メトキシ-5- メチルアニリド；

2-[2- オキソ-1- ピロリジニル]-プロピオン酸-2, 6- ジクロロアニリド；

2-ピロリドン- アセタミド；

1-アニソイル-2- ピロリジノン；及び

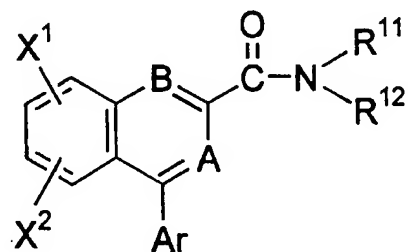
4-ヒドロキシ-2- オキソ-1- ピロリジンアセタミド

からなる群から選ばれる物質を有効成分として含む請求の範囲第1項ないし第10
項のいずれか1項に記載の予防及び／又は治療剤。

13. 2-オキソ-1- ピロリジニル酢酸 2, 6- ジメチルアニリド、2-ピロリドン- アセ
タミド、1-アニソイル-2- ピロリジノン、及び4-ヒドロキシ-2- オキソ-1- ピロリ
ジンアセタミドからなる群から選ばれる物質を有効成分として含む請求の範囲第
1項ないし第10項のいずれか1項に記載の予防及び／又は治療剤。

14. 2-オキソ-1- ピロリジニル酢酸 2, 6- ジメチルアニリドを有効成分として含む
請求の範囲第1項ないし第10項のいずれか1項に記載の予防及び／又は治療剤。

15. 下記の式：

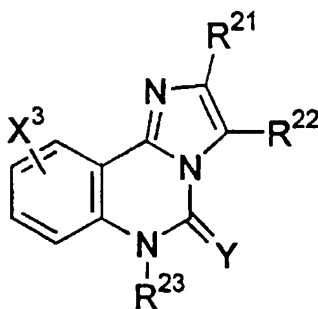


〔式中、R¹¹ 及びR¹² はそれぞれ独立に 1～6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐
鎖のアルキル基、 3～7 個の炭素原子を有するシクロアルキル基、アルキル部分の
炭素原子数が 1～3 個であるフェニルアルキル基若しくはシクロアルキル置換アル
キル基、又は 3～6 個の炭素原子を有するアルケニル基若しくはアルキニル基（た

だし、二重結合又は三重結合は窒素原子に関して1-2 位に位置しない) を示し; A およびB はそれぞれ独立にN 又は CH を示し; X^1 及び X^2 はそれぞれ独立にハロゲン原子、1~3 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、1~3 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基、ニトロ基、又はトリフルオロメチル基を示し; Arはフェニル基、ピリジル基、チエニル基、又は置換フェニル基(フェニル基上の置換基は、ハロゲン原子、1~4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、1~4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基、1~4 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキルチオ基、トリフルオロメチル基、及びニトロ基からなる群から選ばれた1 個又は2 個の置換基である) を示す) で表される化合物を有効成分として含む請求の範囲第1 項ないし第10項のいずれか1 項に記載の予防及び/又は治療剤。

16. N-メチル-N-(1-メチルプロピル)-(2- クロロフェニル) イソキノリン-3- カルボキサミド、N-メチル-N-(1-(S)-メチルプロピル)-(2- クロロフェニル) イソキノリン-3- カルボキサミド、及びN-メチル-N-(1-(R)-メチルプロピル)-(2- クロロフェニル) イソキノリン-3- カルボキサミドからなる群から選ばれる化合物を有効成分として含む請求の範囲第15項に記載の予防及び/又は治療剤。

17. 下記の式:



[式中、 R^{21} は未置換フェニル基、置換フェニル基(フェニル基上の置換基は、ハロゲン原子、1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、及び 1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基からなる群から選ばれる1 個又は2 個の置換基である)、又はチエニル基を示し; R^{22} は水素原子又はハロゲン原子、置換基を有していてもよい 1~6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖

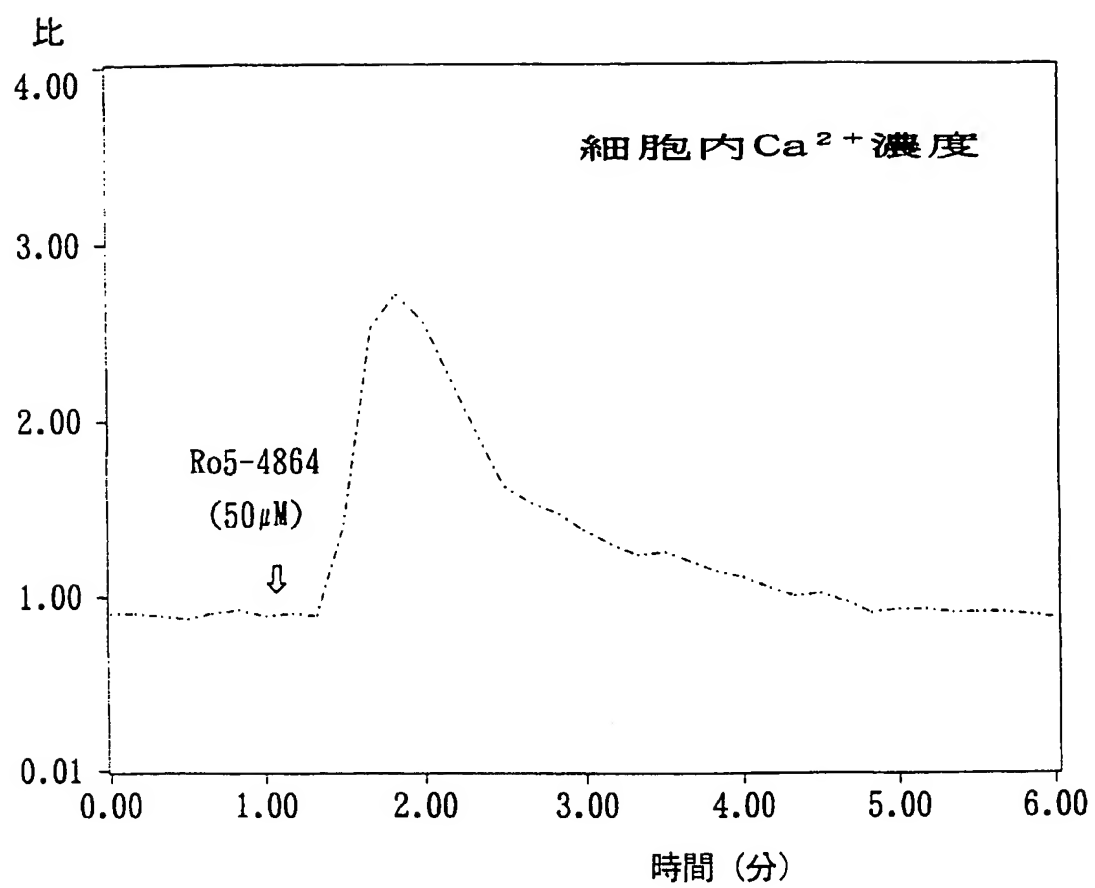
のアルキル基（置換基はアミノ基、アルキルアミノ基、及びジアルキルアミノ基から選ばれる）を示し； R^{23} は $(R^{24})(R^{25})N-CO-Q-$ で表される基（式中、 Q は 1～6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキレン基であり、 R^{24} 及び R^{25} はそれぞれ独立に 1～6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、未置換フェニル基、又は置換フェニル基（フェニル基上の置換基は、ハロゲン原子、1～6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルキル基、及び 1～6 個の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖のアルコキシ基からなる群から選ばれる 1 個又は 2 個の置換基である）を示し； X^3 は水素原子又はハロゲン原子を示し； Y は酸素原子又は硫黄原子を示す）で表される化合物を有効成分として含む請求の範囲第 1 項ないし第 10 項のいずれか 1 項に記載の予防及び／又は治療剤。

18. 2-(3-クロロフェニル)-3-ブromo-6-(N-メチル-N-フェニルアセトアミド)-5-オキソ-5,6-ジヒドロイミダゾ[1,2-c]キナゾリンを有効成分として含む請求の範囲第 17 項に記載の予防及び／又は治療剤。

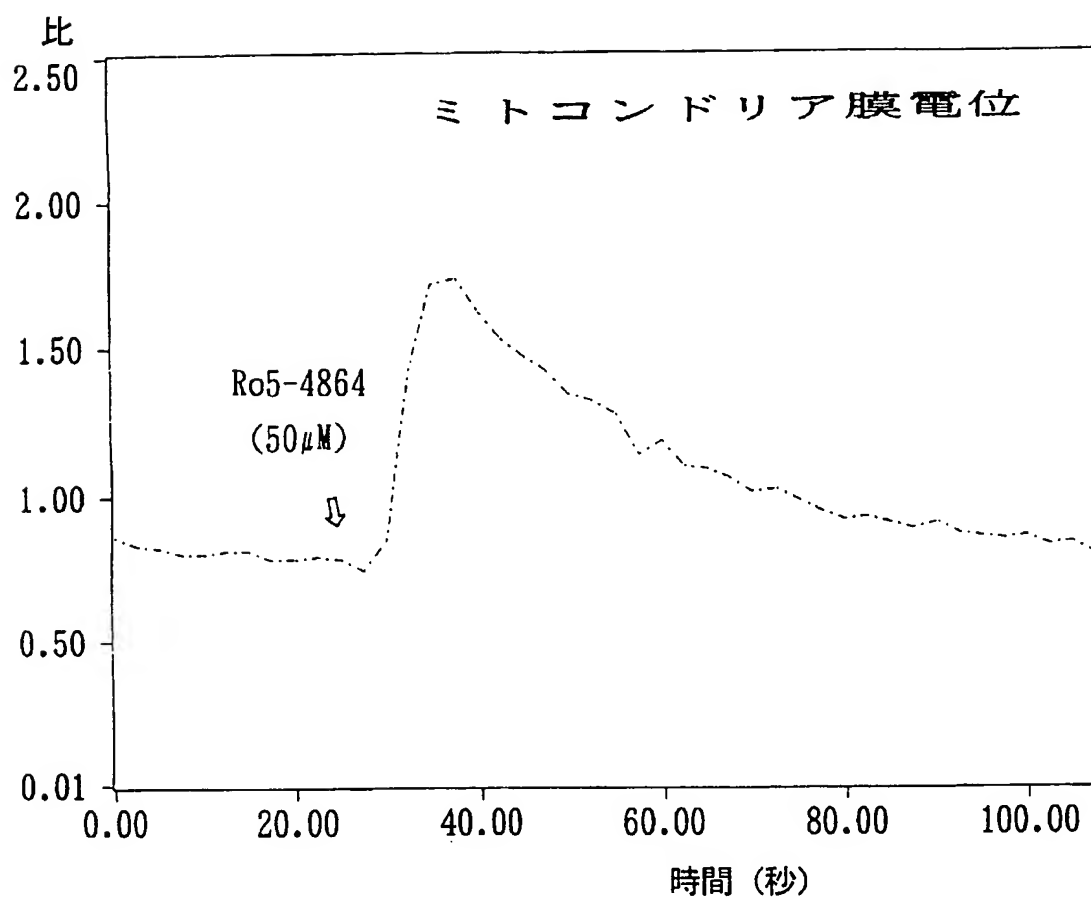
19. ミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプターアンタゴニストを有効成分として含むミトコンドリアの膜安定化剤。

20. ミトコンドリアベンゾジアゼピンレセプターアンタゴニストを有効成分として含むミトコンドリアの膜電位安定化剤。

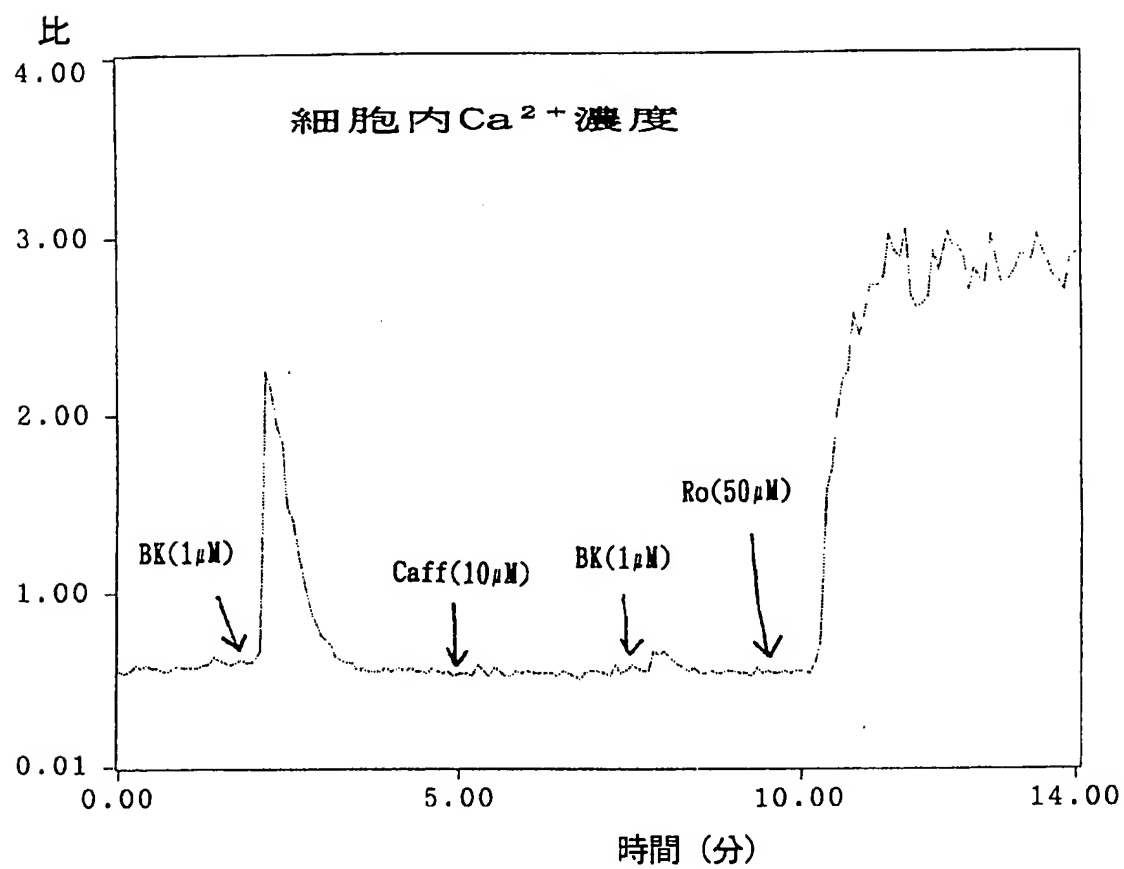
第1図



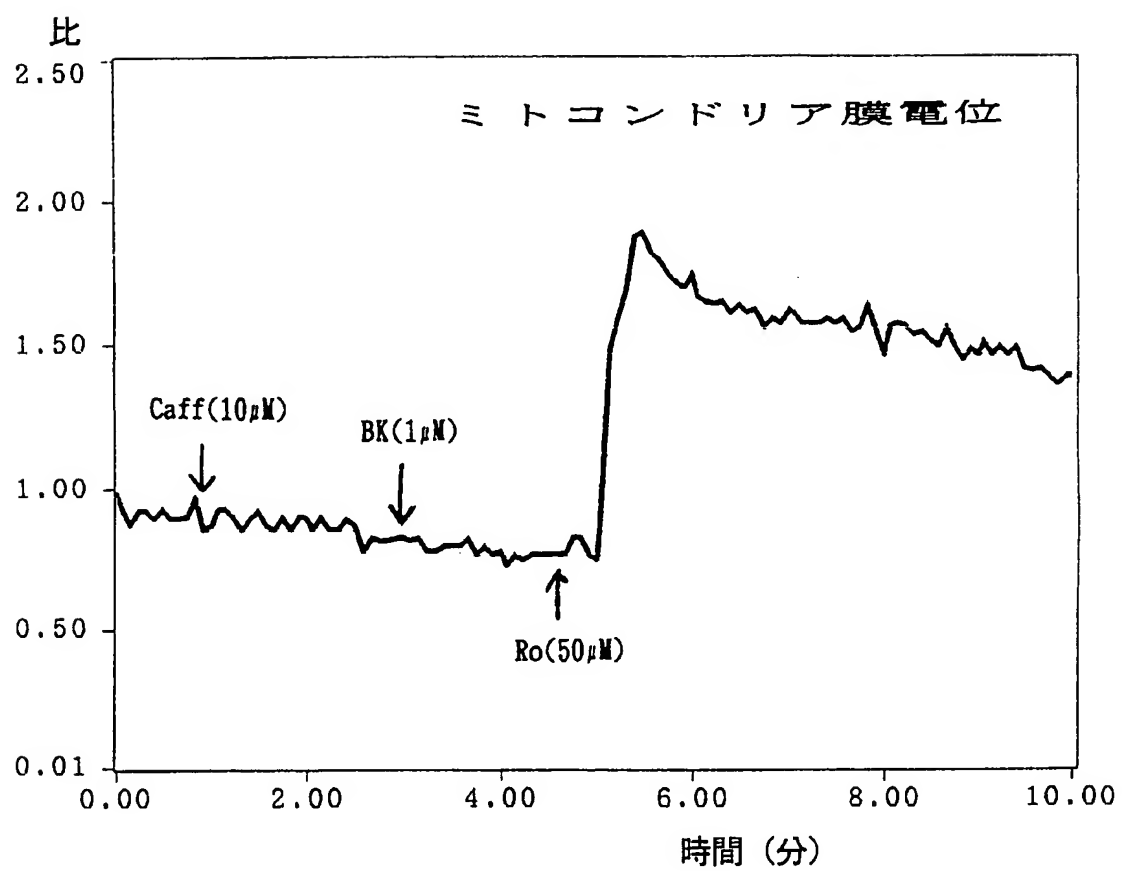
第2図



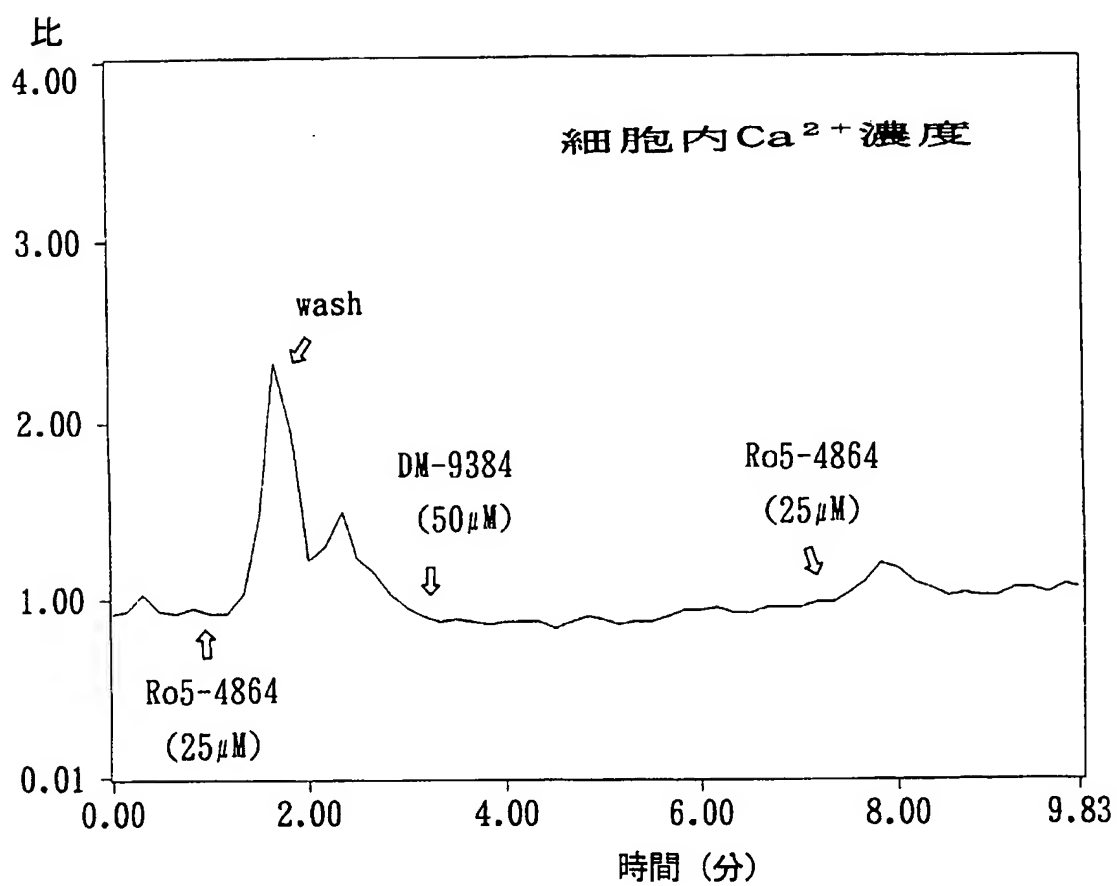
第3図



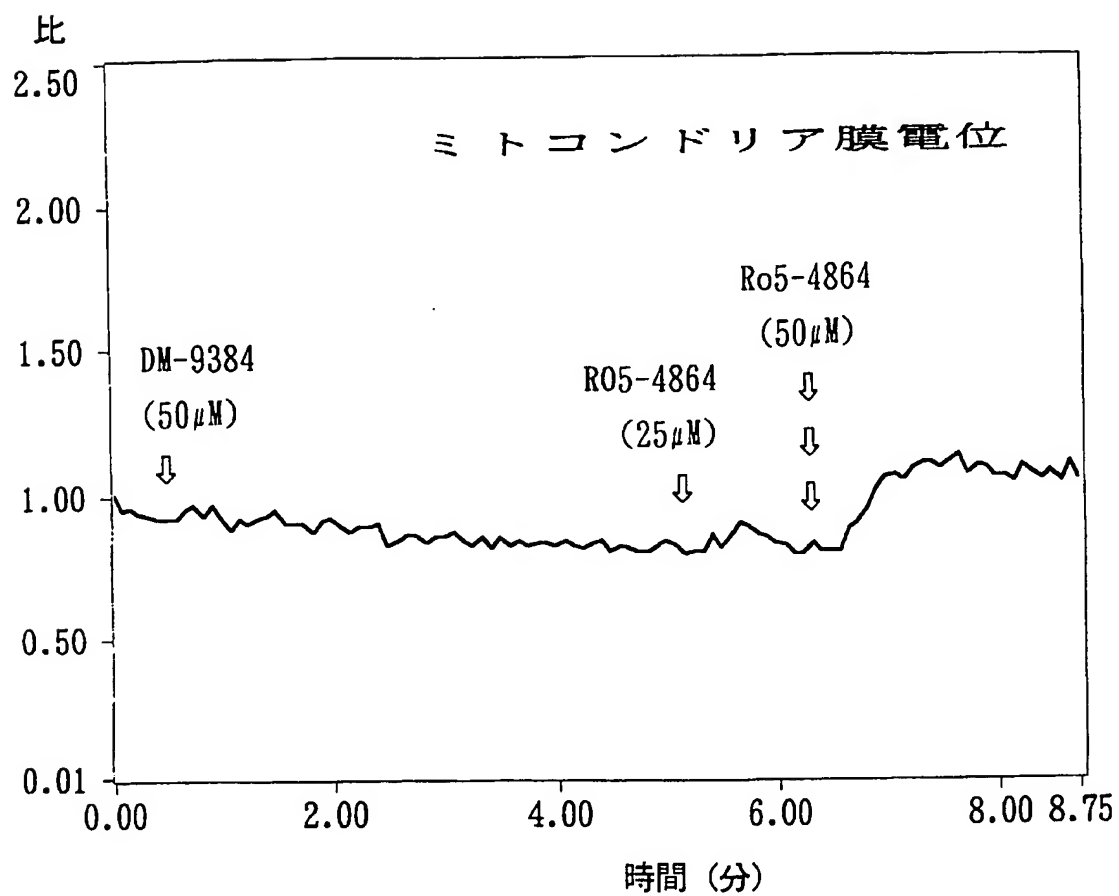
第4図



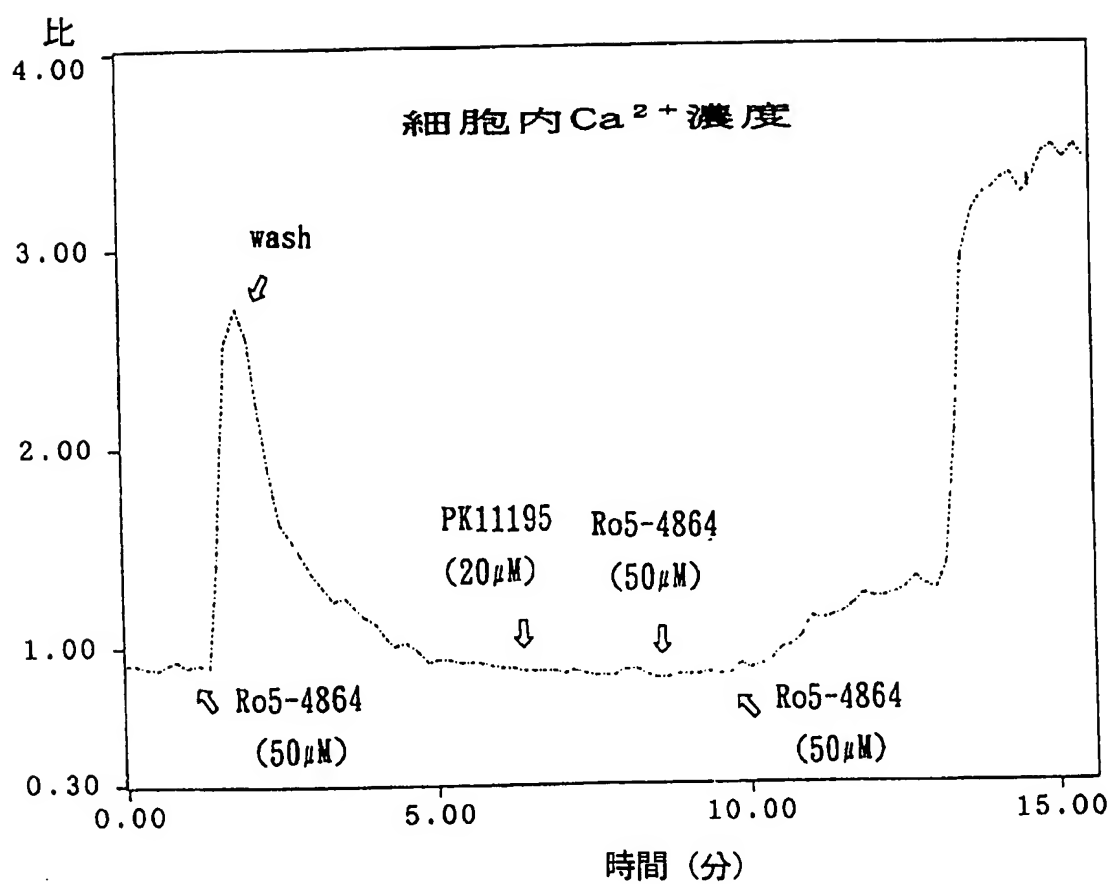
第5図



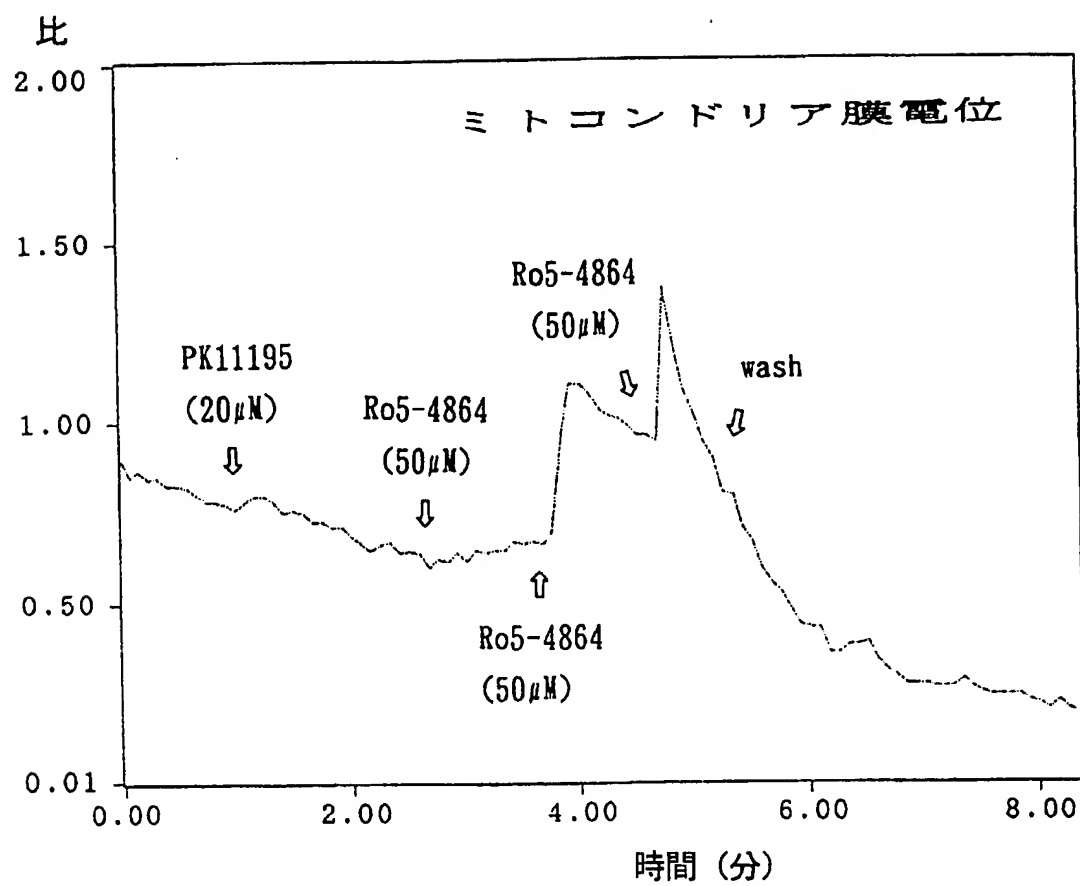
第6図



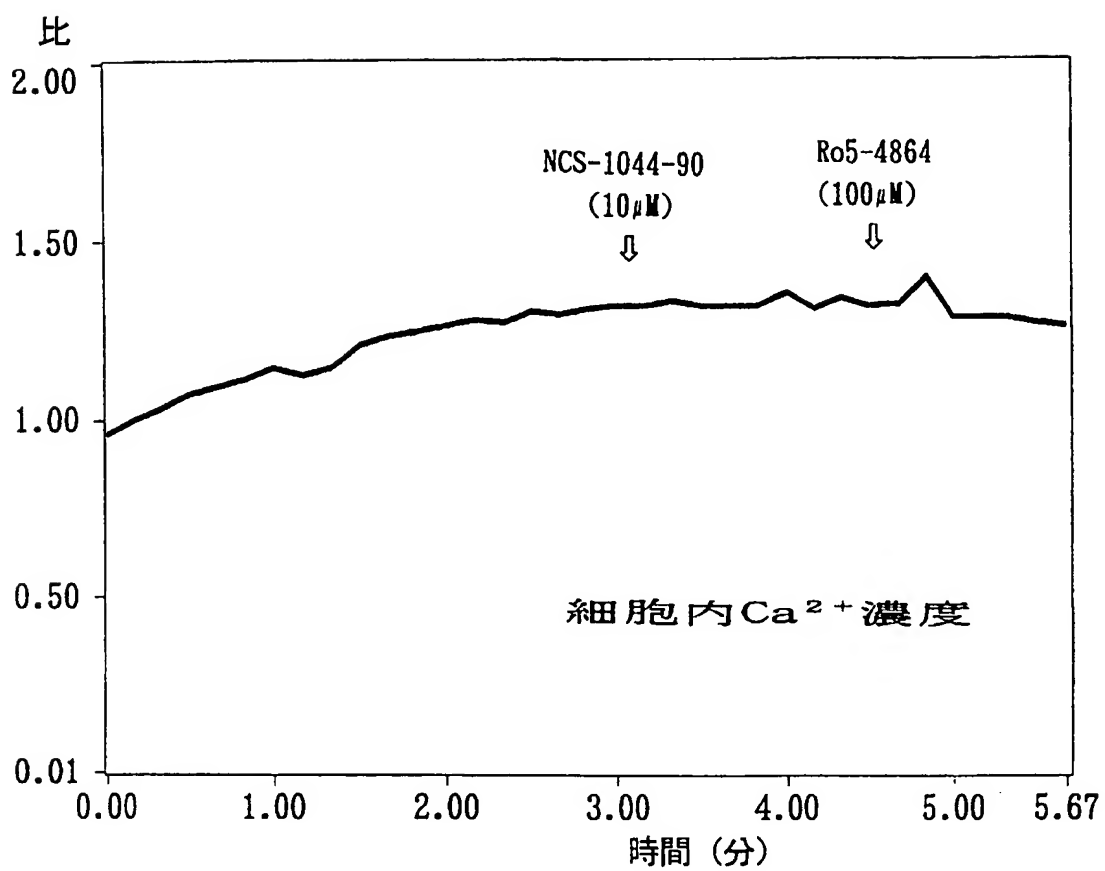
第7図



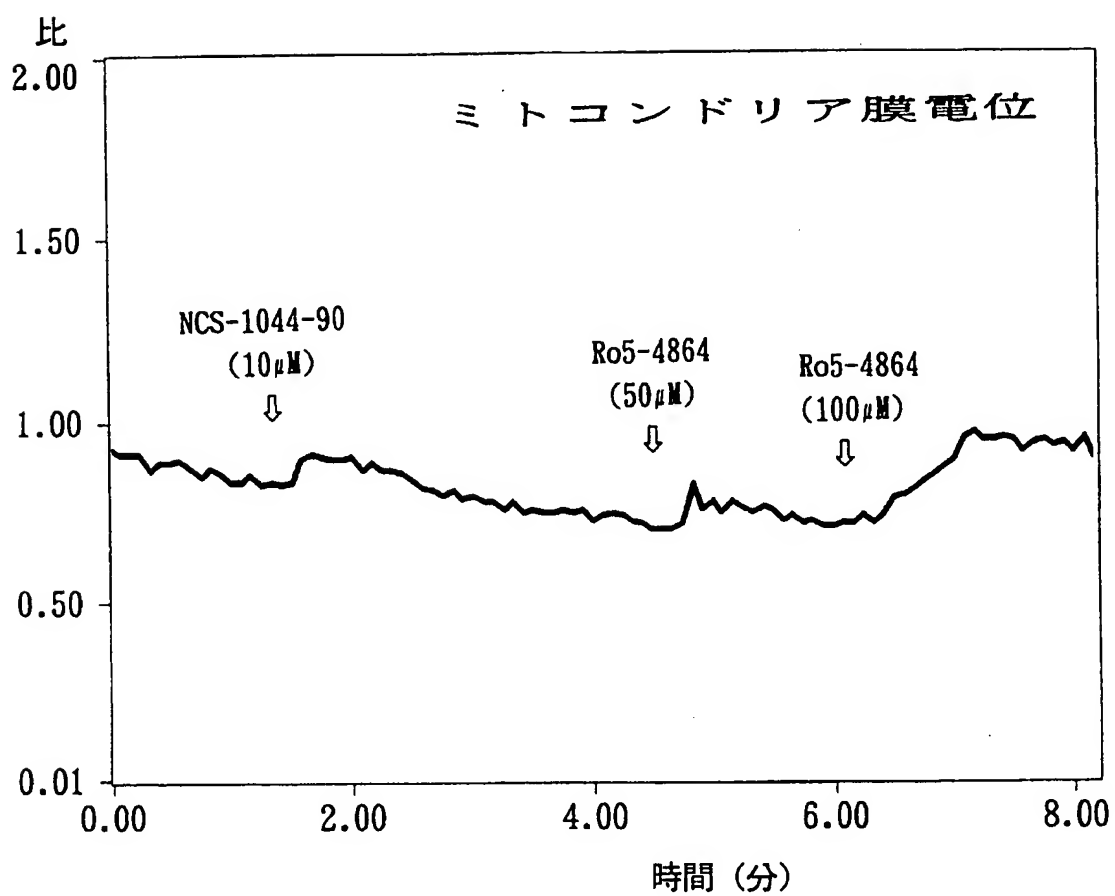
第8図



第9図



第10図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K45/00, A61K31/40, A61K31/47, A61K31/505, C07D207/27, C07D207/273, C07D239/28, C07D217/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K45/00, A61K31/40, A61K31/47, A61K31/505, C07D207/27, C07D207/273, C07D239/28, C07D217/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 2-256617, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), October 17, 1990 (17. 10. 90), Pages 2, 8 (Family: none)	1 - 20
A	WO, 9519170, A (Rhone-Poulenc Rorer S.A.), July 20, 1995 (20. 07. 95), Pages 1, 7 & JP, 9-507498, A	1 - 20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 20, 1997 (20. 11. 97)

Date of mailing of the international search report

December 2, 1997 (02. 12. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03485

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl⁶ A61K45/00, A61K31/40, A61K31/47, A61K31/505, C07D207/27, C07D207/273, C07D239/28, C07D217/26

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl⁶ A61K45/00, A61K31/40, A61K31/47, A61K31/505, C07D207/27, C07D207/273, C07D239/28, C07D217/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 2-256617, A (旭化成工業株式会社) 17. 10月. 1990 (17. 10. 90) 第2及び8頁 (ファミリーなし)	1-20
A	WO, 9519170, A (RHONE-POULENC RORER S. A.) 20. 7月. 1995 (20. 07. 95) 第1及び7頁 & JP, 9-507498, A	1-20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 11. 97

国際調査報告の発送日

02.12.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4C

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3452